

L1 ANSWER 3 OF 3 WPINDEX COPYRIGHT 2004 THE THOMSON CORP on STN
 AN 1989-374369 [51] WPINDEX
 DNN N1989-284963 DNC C1989-165935
 TI New medical material - comprises soluble collagen prod. with high mol.
 materials e.g. polyethylene, etc. crosslinked with mono saccharide(s).
 DC A96 D22 P34
 PA (NIHA-N) NIPPON HAM KK
 CYC 1
 PI JP 01280465 A 19891110 (198951)* 5 <--
 JP 2607266 B2 19970507 (199723) 5 A61L027-00
 ADT JP 01280465 A JP 1988-109552 19880502; JP 2607266 B2 JP 1988-109552
 19880502
 FDT JP 2607266 B2 Previous Publ. JP 01280465
 PRAI JP 1988-109552 19880502
 IC A61L017-00; A61L027-00; A61L029-00
 ICM A61L027-00
 ICS A61L017-00; A61L029-00
 AB JP 01280465 A UPAB: 19930923
 New medical material comprises soluble collagen partially or totally
 crosslinked with monosaccharides. Collagen is simple or cpd. prod. with
 insol collagen or other high mol. materials. Pref. reinforcing high mol.
 materials are e.g., polyethylene, natural, silicone, polyurethane,
 polypropylene, and polyester. Monosaccharides are e.g., aldoses, ketoses,
 and their phosphoric esters. Cr6sslinking is conducted by adding
 monosaccharides to aqueous solution of soluble collagen and allowing to
 react at
 ordinary temperature-50 deg. C. Insol. collagen is obtd., e.g., by
 defatting of
 animal corium tissues followed by extraction with buffer solution of citric
 acid
 and dialysis.
 USE/ADVANTAGE - Crosslinked collagen is safe to body due to
 nontoxicity of monosaccharides. Crosslinking is feasible by simpler
 procedures under milder conditions. Even excessive treatment cannot impair
 biocompatibility. Crosslinking method achieves incompatible high
 flexibility and high strength, especially good strength under wet
 conditions,
 facilitating suturing operations.
 0/0.
 FS CPI GMPI
 FA AB
 MC CPI: A03-C01; A12-V03; D09-D

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平1-280465

⑤ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)11月10日

A 61 L 27/00
17/00
27/00
29/00

V-6971-4C
6971-4C
Q-6971-4C
T-6971-4C

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 医用材料

⑯ 特 願 昭63-109552

⑰ 出 願 昭63(1988)5月2日

⑱ 発 明 者 夏 目 徹 京都府京都市右京区山ノ内宮前町7番地 ヴィラ宮前406
⑱ 発 明 者 清水 慶彦 京都府宇治市木幡御蔵山39-676
⑱ 発 明 者 日 野 常 稔 京都府京都市左京区田中東高原町27番地
⑱ 発 明 者 牧 原 俊 和 兵庫県加古川市平岡町新在家2-159-8
⑱ 発 明 者 太 治 司 郎 大阪府池田市住吉1丁目11-6
⑲ 出 願 人 日本ハム株式会社 大阪府大阪市東区南本町4丁目47番地
⑲ 代 理 人 弁理士 鎌田 文二

明 細 書

1. 発明の名称

医用材料

2. 特許請求の範囲

(1) 単独または不溶性コラーゲンもしくは他の高分子物質と組み合わせて加工される可溶性コラーゲンの一部もしくは全部を、単糖類によって架橋させたことを特徴する医用材料。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明はコラーゲンを主要素材とする生体適合性の優れた医用材料に関するものである。

(従来の技術)

昨今、医療技術の進歩に伴って、医用材料に関する研究も盛んになり、合成もしくは天然の高分子物質を素材とする数多くの医用材料が提供され使用されつつある。たとえば、各種の輸液チューブ、カテーテル、手術糸、人工皮膚、人工胸膜、人工心膜、その他癌防止膜、人工胸壁、人工気管、人工食道、人工腱、人工血管などをあげるこ

とができ、生体の内外で広く検討されている。これらは各種素材を繊維状、糸状、フィルム状、不織布状、布状、メッシュ状、スポンジ状、管状その他の形状に成形加工し、またはさらにこれらを適宜組み合わせて使用目的に最も合致する形状にして用いられている。これらの成形された医用材料に生体親和性、抗凝血性、抗菌性などの機能を向上させるため、その表面にコーティング、グラフトなどの方法で種々な生理活性物質を複合させる試みも見られる。

ここで、医用材料の具備すべき条件は、その使用目的、使用場所、使用期間、血液との接触の度合などによって軽重の差はあるものの、①毒性、抗原性、発癌性のないこと、②生体親和性のあること、③血液適合性のあること、④生体使用場所周辺との物理的・力学的性質の相違が小さいことなどであり、さらに、特に生体内移植物については、⑤生体の自己修復能が発揮され、移植目的が達成された後に、その移植物が生体内で温和に消化吸収されるか、または生体と一体となって永久

に異物感の無いことが理想であると考えられるようになってきた。そこで、多くの検討がなされた結果、各種の天然および合成高分子物質の中で、コラーゲン特に可溶性コラーゲンがこれらの条件を殆どすべて満たしており、医用材料の素材として最も優れていることが認められている。しかし、このコラーゲンは生体親和性が高く、細胞生育の足場ともなる反面、それだけに生体内における消化吸収性が良く、無処理のままでは生体の修復よりも先に消失したり、消失しないまでも移植後短日時の間に力学的強度が低下したりする。このような欠点を除くため力学的強度のある他の合成高分子素材と複合させたり、コラーゲン自体を架橋させたりして消化速度の制御が図られている。

発明者らは永年にわたってコラーゲンの医用への応用についての研究を行ない、コラーゲン特有の生体親和性を損わずに消化速度を任意に制御でき、力学的性質も良好となる架橋法について種々検討してきた。ここで、コラーゲンの架橋法としては、放射線、電子線、紫外線、プラズマなど

による架橋効果が大きい。これを過度に使用するとコラーゲンは硬化が進み、柔軟性を失い、生体親和性のない脆いプラスチック様の物質に変化してしまうおそれがある。

一方、蛋白質と糖類との反応が、古くからメイラード (Maillard) 反応として知られていて、蛋白質中の遊離アミノ基と糖類の配糖体形成能を有する水酸基との間に縮合反応が起こり、さらに分解、重合反応を起こして含窒素褐色物質を生成すると考えられ、一般に乳製品、菓子、果実、果汁、ミソ、醤油、ミリンなどの食品の褐変現象などに深く関係があり、蛋白質の不溶化、食味および栄養価の低下などにつながるものとされ、コラーゲンの架橋法として積極的にこの反応を利用しようとする試みは殆んど見られなかった。ただ、特公昭58-38134号において、特定条件下で還元糖をコラーゲンの処理剤の一部に利用し、食品用コラーゲンケーシングの食味および物性を改良しようとする技術が開示されているに過ぎない。

〔発明が解決しようとする課題〕

特開平1-280465 (2)

による照射法、またはホルマリン、グルタルアルデヒド、ジアルデヒド澱粉等のアルデヒド類もしくはエポキシ化合物による化学的架橋法などがよく知られている。しかし、これらの方法にはそれぞれ一長一短があり、医用材料に用いるコラーゲンの架橋法としては満足できるものではなかった。たとえば、放射線、電子線の場合、原料に異物が混入する恐れはないが、他に難点がある。すなわち、コラーゲンはこれらの放射線によって元来分解されやすい高分子物質であり、最適照射条件の設定が困難で、過度の照射では分解が優先し目的を達成できない恐れがあり、プラズマの場合も同様である。これらと比較して紫外線の場合は比較的温和な処理ではあるが、反面透過力が小さく厚物の成形物に対しては表面には有効であっても深部にはほとんど作用せず無効に近い。また、化学的架橋法は、用いる試薬の殆どが生体にとって有害な物質であるから、架橋後の試料中に残留する物質の影響を考慮する必要がある。特に、現在比較的良好に使用されているグルタルアルデヒ

以上述べたように、コラーゲンが医用材料の素材として非常に優れた性質を有しながら、生体内における消化速度が過度に制御されて、しかも、毒性の全くない安全なコラーゲンからなる医用材料は従来の技術においては得られていないという問題点があり、これを解決することが課題となっていた。

〔課題を解決するための手段〕

上記の課題を解決するために、この発明は単独または不溶性コラーゲンもしくは他の高分子物質と組み合わせて加工される可溶性コラーゲンの一部もしくは全部を、単糖類によって架橋させた医用材料とする手段を採用したものである。以下その詳細を述べる。

まず、この発明におけるコラーゲンは、古くからよく知られた硬蛋白質に属する物質で、哺乳類の真皮組織などを構成する繊維状蛋白質という歴史的な狭義のコラーゲンのみを意味するものではなく、その後判明した哺乳類のみならず鳥類、両生類、魚類その他多くの動物にも広く分布してい

特開平1-280465(3)

る類似蛋白をも包含する広義のコラーゲン（膠原質）をいう。そして、最も現実的で有力な供給源は、屠殺された獣類の新鮮な真皮組織であり、これを原料としてたとえば有機溶媒による抽出、水洗、無塩溶液による抽出、酸およびアルカリ処理、酵素処理などによって混在物質を除去して不溶性コラーゲンを残す方法、または新鮮な真皮組織を脱脂した後、定められたクエン酸緩衝液で抽出および透析するか、一定のリン酸水素二ナトリウムで抽出および透析し、得られた沈澱を再び一定のクエン酸緩衝液で抽出、透析して可溶性コラーゲン（再生コラーゲン、プロコラーゲン、E.S.コラーゲンとも呼ばれる）を得る方法などによって不溶性のコラーゲンを適宜分類することができる。

つぎに、この発明における不溶性コラーゲンはたとえば上記の方法によって得られる強靱な物質であり、またその他の高分子物質、たとえばポリエチレン、天然ゴム、シリコン、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエステルなどはいずれも補強用に複合される素材であり、医用材料としての

使用目的、使用場所、使用時間、血液との接触の度合によって当然選択使用されるものであり、この発明においてはこれらの種類、使用量等を特に限定するものではない。

さらに、この発明における単糖類は、同記メイルード反応を起こし得るもの、すなわちコラーゲン中の遊離アミノ基配糖体形成能を有する水酸基を有する糖類で、特に生体に対する安全を考慮すれば、具体的には生体中に通常単体または誘導体として存在するペントース、ヘキソースに属するアルドース、ケトースおよびこれらのリン酸エステルをも含めた単糖類を最も望ましいものとして例示することができる。そして、これら単糖類を可溶性コラーゲン水溶液中に添加混合し、常温もしくは50℃程度以下に加温しながら反応を進行させ適宜成形すればよい。この際の単糖類の添加量は反応生成物の重合度の程度によって調節すればよく、この添加量または単糖類の種類等によって反応生成物の着色の程度が変わるが、この発明に直接支障を来すものではない。

〔作用〕

単糖類の種類、添加量を調整し、可溶性コラーゲンの架橋の程度を任意に変化させることがきわめて容易であるから、この発明のコラーゲンからなる医用材料は生体内において適度に制御された消化作用を示すことになる。

〔実施例〕

実施例1：

可溶性コラーゲンの1%（%は重量パーセント、以下同じ）水溶液（pH=3）100mlずつを5個のガラス容器に分取し、内1個はそのまま（対照品）とし、他の4個には単糖類としてそれぞれリボース、グルコース、グルコース-6-リン酸塩、フラクトースを0.1gずつ加えて溶解した。溶解後脱泡したそれぞれの液を、プラスチック製平板容器（縦10cm、横10cm、深さ2cm）に流延して30℃以下で通風乾燥し、厚さ約100 μ mの均一透明フィルムを得た。この乾燥フィルムを飽和アンモニアガス含有の空気浴中に約1時間放置し、再び通風乾燥した。各単糖類添加フィルムは糖の種類により

濃淡はあるもののすべて淡黄褐色透明のフィルムとなった。これらのフィルムの一部を切り取り、純水に浸して24時間後の重量膨潤度を測定したところ、第1表のような結果であった。

第 1 表

添加糖類の種類	フィルムの重量膨潤度(倍)
リボース	4.7
グリコース	12.3
グリコース-6-リン酸塩	9.6
フラクトース	8.2
対照品（無添加）	>50

実施例2：

実施例1と同様にして糖無添加のコラーゲンフィルムを作製した。ついで、0.15mol、pH7.4のリン酸緩衝液に0.3molのリボースを溶解した処理液200mlを調整し、この液に約5cm平方のコラーゲン数枚を浸漬し、37℃に保持した。そして、第2表に示すような所定時間ごとに1枚ずつ取出し、水洗後、常温で風乾させた。実施例1と同様にして重量膨潤度を測定した結果は第2表のとおりであった。

(4)

特開平1-280465(4)

第 2 表

浸漬時間(日)	フィルムの重量膨潤度(倍)
0	>5.0
1	2.5
2	2.3
3	2.3
7	2.4

実施例3:

実施例1と同様にして作製したコラーゲンフィルムを用い、実施例2と同様の緩衝液で緩(リボース)濃度の異なる6種の処理液を調製し、それぞれの処理液に複数枚のコラーゲンフィルムを浸漬して37℃に保持した。そして第3表に示すような所定時間ごとに試料を取り出し、乾燥後重量膨潤度を測定した。その結果は第3表のとおりである。

第 3 表

リボース濃度(mol)	重量膨潤度(倍)		
	24時間処理物	48時間処理物	108時間処理物
0.005	5.5	5.2	5.1
0.01	5.3	4.2	4.2
0.05	4.7	3.9	3.8
0.1	4.6	4.0	4.1
0.2	4.4	4.2	4.2

で測定した結果は第4表に示すとおりであり、乾燥強度では架橋の強弱に余り左右されず、湿潤時には架橋度の増大と共に強度も向上する傾向を示した。また、これらのフィルムは、引張り強度が高いのみでなく、柔軟で韌性に富み、生体組織中に移植する際に破損したり、縫合の際に手術糸による亀裂が生じたりしなかった。

第 4 表

重量膨潤度(倍)	乾状態強度(kg/cm ²)	湿潤状態強度(kg/cm ²)
5.3	11.8	0.54
5.2	—	0.60
4.4	14.2	1.03
4.0	9.3	1.22
2.5	9.8	1.55

(2) 消化試験:

架橋度(膨潤度)の異なる数種の試料についてインビトロで消化試験を行なった。10mgの試料を消化酵素コラーゲナーゼの1010/μl、溶液(ペロナール緩衝液、pH7.4)5mlに浸漬して37℃に保持、固形のコラーゲンが消化されて完全に液を消すまでの時間を計った。その結果は第5表のとおりで

実施例4:

可溶性コラーゲンの0.5%水溶液を調製し、あらかじめ内面をプラズマ処理した培養皿80個(内径6.0cmの大型のもの20個、内径3.5cmの小型のもの60個)にそれぞれ大型のものには3ml、小型のものには1ml宛を添加して充分底面に展開させた後、風乾した。その後実施例3と同様の糖濃度の異なる6種の処理液を大型のものには各15ml、小型のものには各5ml宛を添加し、37℃に24時間保持して処理液を除き、軽く水洗した後通風乾燥させた。これらの培養皿はインビトロ(in vitro)での細胞培養試験に供した。

以上の実施例において作製した各フィルムを試料として引張り強度測定、インビトロの消化試験、培養皿による細胞培養テスト、生体組織内への埋め込み試験を行なった。なお、試料の区別は前記各実施例における重量膨潤度(倍)で示した。

(1) フィルム(厚さ100μm)の引張り強度測定:

試験片は幅1cm、長さ5cmの短冊型とし、インストロン型万能試験機を用い、試験速度20mm/分

あった。

第 5 表

重量膨潤度(倍)	100%消化時間(時間)
>5.0(未架橋物)	2.4
5	4.8
4.5	5.6
4	9.6
2.5	>12.0

架橋度が増大するにつれて消化時間は延長され、体内に移植した場合必要に応じて存在期間を調整することが可能であると考えられた。

(3) 培養皿による細胞培養テスト:

実施例4によって作製した培養皿を用い、常法に従って繊維芽細胞(3T3)の培養試験を行なった。結果は第6表のとおりである。

第 6 表

処理液中の糖濃度	生育細胞の数の培養日数			
	1.0	2.5	3.5	4.5
無添加	19	122	280	350
0.005(mol)	18	120	286	344
0.01	19	95	239	367
0.05	19	60	134	223
0.1	13	37	53	67
0.2	14	27	20	43

処理液の温度が増加するに従い細胞の生育数は減少するが高度の処理物でも細胞との親和性は消失することがない。また、広く自由に細胞との親和性を調節することが可能である。

(4) 生体組織中への埋め込み試験：

各種の処理フィルムを家畜背部皮下組織に埋め込み組織反応などを定性的に調べた。通常未処理のコラーゲンフィルムは移植後1週間で完全に組織と接合し、3週間後には消化吸収されてしまうが、この発明の法で処理したコラーゲンの場合は、処理が高度になるほど組織内での残存率が高く、インビトロの消化テストと一致した。また、強い組織反応も見られず生体適合性は良好であった。

〔効果〕

以上この発明による医用材料は未処理コラーゲンを用いたもの、または他の方法で架橋したものに比べて、多くの利点が見出され、つぎのようにまとめることができる。すなわち、

- (1) 単糖類自身がコラーゲンと同様、生体内物質であり、しかも低分子化合物であるため、生

体に全く害を及ぼさず毒性、抗原性、発癌性などを考える必要がない。

- (2) 簡単な操作、温和な条件で架橋可能であり、しかも広い範囲に渡って自由に架橋の速度を制御することができる。

- (3) 過度の処理でも生体適合性を失うことがない。

- (4) 他の架橋法では実現困難であった柔軟性と強度の保持の両者を共に満足させることができ、特に濡潤状態での強度が向上し、生体組織との手術糸による縫合が容易となる。
などであるから、この発明の意義はきわめて大きいといえる。

特開平1-280465(5)

特許出願人 日本ハム株式会社

同 代理人 鎌 田 文 二